中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 49(4): 29～38 (2000)

湖北貝母組織培養之研究

I.不同來源培植體誘導鱗片及胚狀化癒合組織之形成[1]

蕭翌柱[2]　戴宗德[3]　陳忠川[3]　蔡新聲[2]

摘要：貝母首載于神農本草經，列入草部中品，歷代諸家本草均有著錄。湖北貝母爲百合科多年生草本植物，多以地下鱗莖入藥，爲重要且廣泛使用的中藥，歷年來多採用傳統之鱗莖無性繁殖，但繁殖係數與產量皆低，故常有藥源短缺，不敷醫療所需之虞，爲求改善此一問題，本研究乃進行湖北貝母組織培養，期能大量繁殖種苗，縮短生育週期，以供應國人藥用之需。結果顯示，將湖北貝母之葉片、莖段基部、鱗片及芽球相似體(Protocorm-like-body, PLB)等四種培植體，培養於含MS基本鹽類並添加0.5 mg/l BA之培養基中60天，鱗片培植體可獲得54.7%再生鱗片誘導率最佳，且褐化死亡率較少；但每個培植體形成新鱗片數目則以莖段基部平均5.6個最佳；擬胚化癒合組織之誘導則以PLB及莖段基部的36.1%及30.6%較佳。另將鱗片和莖段基部培植體培養於添加0.5 mg/l BA配合0.25-4.0 mg/l NAA的培養基中，則分別有62-78%及68-72%的再生鱗片誘導率，顯示鱗片和莖段基部可能較適於誘導新鱗片再生。此外，培植體和新根系之誘導也以莖段基部培植體培養於含0.5 mg/l BA和4.0 mg/l NAA之MS培養基較佳。

關鍵詞：湖北貝母、芽球相似體、組織培養、大量繁殖。

前　　言

貝母首載于神農本草經，列入草部中品，梁陶弘景(西元452-536)曰：「形如聚貝子，故名貝母」，歷代諸家本草，如本草綱目及綱目拾遺等均有著錄，並有莔(爾雅音萌)、勤母、苦菜、苦花、空草、貝父及藥實等別名，在藥物配伍上則以厚朴、白微爲使；畏秦艽；反烏頭[5, 9, 10]。本草綱目以前的醫藥文獻對於貝母來源並未有明確分類，直到明倪朱謨所著本草匯言始有「川貝爲妙」之說；清吳儀洛本草從新一書始列「象貝母」和「土貝母」。近代大陸地區按藥用習慣常將貝母概分爲浙貝和川貝兩大類，浙貝苦寒，性利能化堅痰，主產於浙江省象山地區；川貝補氣利痰，虛咳者宜之，主要由雲南、四川二省所出，可再細分爲松貝、青貝和爐貝三種，其中又以松貝粒小緊實最爲珍貴。此外，尚有產於天山山脈的新疆貝母及出自河南、陝西等地，具有散結毒、消癰腫之土貝母等[2]。

近年來爲廣泛收集貝母屬(*Fritillaria*)基源植物並擴大藥材來源，在湖北省西部和四川東部發展出一種湖北貝母(*Fritillaria hapehensis* Hsiao *et* K.C.Hsia)又名板貝，可視爲川貝之一種，其中尤以湖北恩施州所產者，與窯歸(*Angelica sinensis*)、板黨(*Codonopsis pilosula*)、紫油厚朴(*Magnolia officinalia*)、雞

1.行政院農業委員會農業試驗所研究報告第2042號。

2.本所農藝系助理、研究員。台灣省　台中縣　霧峰鄉。

3.中國醫藥學院藥學研究所前研究生、副教授。台灣省　台中市。

爪連(*Coptis chinensis*)、香獨活(*Angelicapubescens*)、五鶴續斷(*Dipsacus asper*)、皺皮木瓜(*Chaenomeleslagenaria*)、川丹皮(*Paeonia suffruticosa*)和絲綿皮(*Eucommiaulmoides*)，並稱該州十種珍貴的地道藥材[3]。湖北貝母爲百合科多年生草本植物，多以地下鱗莖入藥，爲重要且廣泛使用的中藥，歷年來多採用傳統之鱗莖無性繁殖，但繁殖係數與產量皆低，而且用種量大、抗病虫能力弱；雖然大陸方面已研究採用能自花授粉的利川貝母(*F. lichunensis* P. Li *et* C. P. Yang spnou)爲父本，進行雜交後代選育[1]，然而用雜交種子播種繁殖需4-5年生育期，雜交子代所含藥用成分尚需鑑定分析，故常有藥源短缺，不敷醫療所需之虞，部份地區更有以麗山江慈菇、葫蘆科假貝母等贋品混充，這些僞品不但不具療效，且常延誤病情，甚者更引起中毒，戕害患者健康至鉅。雖然大陸地區多年來積極進行貝母屬藥材之開發及繁殖研究，並已成功利用組織培養技術誘導出包括太白貝母、中華貝母(*F. sinica* S. C. Chen)、浙貝母(*F. thunbergii*)、暗紫貝母和川貝母之癒合組織、再生鱗片和體胚培養[4,11,13,15,16]，但有關湖北貝母之組織培養研究尚付之闕如，本試驗即在進行此一重要藥用植物繁殖技術之開發，期能大量繁殖種苗，縮短生育週期，以供應國人藥用之需。

材料與方法

一、材料

本研究使用之材料，係由四川中醫學院提供之湖北貝母，其鱗片經培養後，形成無菌帶小鱗片之芽球相似體(protocorm like body, PLB)。切取含2-3個小鱗片之PLB團塊，預培養在含MS基本鹽類[27]並添加0.5 mg/l benzylaminopurine (BA)及1 mg/l α-naphthaleneacetic acid (NAA)之固體培養基中，待長出帶莖葉之小鱗莖時，供試驗之用。

二、方法

(一)不同部位培植體之採取

分別切下葉片、小鱗莖及PLB，培養在如上述相同組成份之液體培養基中，經三週培養後，莖葉、小鱗莖及PLB生長迅速，此時切取葉片(5mm × 7mm)、莖段基部(5mm × 5mm)、小鱗片(5mm × 5mm)及PLB(5mm × 5mm)爲供試材料。

(二)培養基組成份及配製

本試驗所用之培養基，以MS基本鹽類爲主要成份，並添加auxin類如NAA、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)及cytokinin類如BA、kinetin等植物生長調節劑，其使用濃度如表1-5所示。此外添加0.9% Difco agar及3%蔗糖。培養基在加入Difco agar煮融前，先用0.1-1N之NaOH或HCl水溶液，調整pH值爲5.7±0.1，每支直徑2.2cm的試管中分裝10 ml培養基，經鋁箔紙封口再以121℃、1.05 kg/cm^{2}之高溫高壓滅菌15分鐘後，擺成斜面放冷備用。

(三)培養環境及試驗分析

以上試驗之調查結果，係採用二項分佈(binomial distribution) 95%信賴區間(confidence limits)檢定處理間之差異；或以least significant difference (LSD 5%) test 檢定之。上述各項試驗中培植體置於溫度24℃的暗櫃或光照12 hr、光照強度2500～3000 lux環境下培養。

結　果

一、BA對湖北貝母不同部位培植體形成幼嫩鱗片與擬胚化癒合組織之影響

將葉片、莖段基部、小鱗片及PLB等湖北貝母不同部位培植體，分別培養在含0.5 mg/l BA之MS培養基中60天，結果有93.3%的葉片產生褐化死亡現象(表1)；莖段基部和小鱗片的褐化率分別爲31.8%、24.3%，與前者比較已有顯著降低之趨勢；PLB培植體培養後產生褐化死亡比率最低，僅有12.3%。此外，在調查不同部位培植體誘導產生新鱗片的比率及個數方面，以莖段基部和小鱗片兩種

培植體的誘發比率最高，分別達到42.6%及54.7%，平均誘發新鱗片數有5.6和3.6個；PLB培植體誘發產生新鱗片比率則爲32.9%，平均誘發新鱗片數有2.9個；至於由葉片培植體誘發產生新鱗片的比率則顯著低於前述三種，僅有6.1%而已。在擬胚化癒合組織(embryogenic callus)的誘導結果則顯示，由PLB和莖段基部培植體之誘導率分別爲36.1%及30.6%，顯著高於由小鱗片和葉片培植體誘導產生之22.1%與1.5%。

表1. 湖北貝母不同部位培植體形成幼嫩鱗片與胚狀化癒合組織之影響[z]

Table 1. Formation of bulbscales and embryogenic callus from different explants of *F. hupehensis*[z]

Explants	Browning	Bulbscale induced		Embryogenic callus induced
	(%)	(%)	Average No.±SE	(%)
Leaf	93.3a[x]	6.1c	3.5±1.5	1.5c
Stem base	31.8b	42.6ab	5.6±0.3	30.6a
Bulb	24.3bc	54.7a	3.6±0.2	22.1b
PLB[y]	12.3c	32.9b	2.9±0.3	36.1a

[z] Data from three independent experiments, each with 10 explants per treatment.

Data obtained from explants were cultured for 60 days.

Culture medium ： MS basic salts with 0.5 mg/l BA, 3% sucrose and 0.9% Difco agar, pH = 5.7.

[y] Protocorm-like-body.

[x] Means followed by the same letter in the same column are not significantly different at 5%level by least significant difference (LSD) test.

二、培養基添加BA和不同濃度NAA對湖北貝母莖段基部培植體生育之影響

將湖北貝母莖段基部培植體培養在含MS基本鹽類並添加0.5 mg/l BA及不同濃度NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4 mg/l)之培養基中60天，結果如表2所示，當培養基中NAA濃度在0.25-4 mg/l時，約有68-72%的供試培植體能形成新鱗片，明顯高於僅含0.1 mg/l低濃度NAA之處理組。在誘導擬胚化癒合組織產生方面，則以培養基添加0.5 mg/l BA配合4 mg/l NAA之50%誘導率較佳；NAA濃度在0.1-2 mg/l之各處理組，擬胚化癒合組織誘導率僅達18-34%。至於培植體誘導新根系的形成比率，也以培養基添加0.5 mg/l BA配合4 mg/l NAA之58%誘導率較佳，略高於其他處理組之18-32%誘導率。

三、培養基添加BA和不同濃度NAA對湖北貝母小鱗片培植體生育之影響

將湖北貝母小鱗片培植體培養在含MS基本鹽類並添加0.5 mg/l BA及不同濃度NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4 mg/l)之培養基中60天，結果如表3所示，當培養基中添加0.5 mg/l BA配合0.5 mg/l NAA時，最高約有78%的供試培植體能形成新鱗片，其它處理組之誘導率也有62-72%，差異不明顯。在誘導擬胚化癒合組織產生方面，各處理組間的差異也不明顯，誘導率約爲28-34%。至於培植體誘導新根系的形成比率，則以培養基添加0.5 mg/l BA配合4 mg/l NAA之42%誘導率較佳，略高於添加0.5 mg/l BA配合2 mg/l NAA處理組之34%，也高於其它處理組之16-24%誘導率。

四、培養基添加BA和不同濃度NAA對湖北貝母PLB培植體生育之影響

將湖北貝母PLB培植體培養在含MS基本鹽類並添加0.5 mg/l BA及不同濃度NAA(0.1、0.25、0.5、1、2、4 mg/l)之培養基中60天，結果如表4所示，當培養基中NAA濃度在0.5-2 mg/l時，約有34-38%的供試培植體能形成新鱗片，略高於含0.1或0.25 mg/l低濃度NAA誘導率分別爲22%和24%之處理組，NAA濃度在4 mg/l時，僅有18%的培植體能形成新鱗片，誘導比率最低。在誘導擬胚化癒合組織產生方面，各處理組間的差異並不明顯，誘導率約爲24-38%，其中又以培養基添加0.5 mg/l BA配合0.5 mg/l NAA之處理組誘導率較高。至於培植體誘導新根系的形成比率，則以培養基添加0.5 mg/l

BA配合2和4 mg/l NAA之誘導率較佳，分別為36%及32%，高於添加0.5 mg/l BA配合0.1-1 mg/l NAA各處理組之14-22%誘導率。

五、培養基添加植物生長調節劑及暗培養對湖北貝母鱗片培植體生育之影響

將湖北貝母鱗片培植體培養於含MS基本鹽類並添加0.5 mg/l kinetin及配合不同濃度2,4-D和NAA之固體培養基中(表5)，經60天黑暗後調查結果，發現培養基同時添加0.5 mg/l kinetin及0.5-1 mg/l 2,4-D之處理組，有63.3-66.3%的供試培植體能形成新鱗片，形成之新鱗片平均數為3.4和4.5個，略高於僅含0.5 mg/l kinetin對照組之43.3%與2.4個新鱗片平均數；培養基如添加8 mg/l 2,4-D，則僅有23.3%的供試培植體能形成新鱗片，形成之新鱗片平均數也只有1.6個。培養基同時添加0.5 mg/l kinetin及0.5-8 mg/l NAA之處理組，有50-56.7%的供試培植體能形成新鱗片，與對照組差異不明顯；但是，含有4 mg/l NAA之處理組其形成之新鱗片平均數最高為5.8個，則優於對照組之2.4個。在誘導擬胚化癒合組織產生方面，不論培養基添加2,4-D或NAA之各處理組間的差異並不明顯，雖然培養基添加1 mg/l NAA配合0.5 mg/l kinetin之處理組誘導率30%略比對照組之16.7%高，但2,4-D濃度達4-8 mg/l之處理組，其擬胚化癒合組織誘導率僅有3.3-6.7%。至於培植體誘導新根系的形成比率，則以培養基添加0.5 mg/l kinetin配合4和8 mg/l NAA之誘導率較佳，分別為53.3%及46.7%，高於對照組之6.7%；如添加0.5-8 mg/l 2,4-D之培養基，其誘導新根系的形成比率僅有3.3-10%。

討　論

利用如根、莖、葉、芽、子房、花粉或花藥等植物各部位器官或組織細胞作為起始之培養材料，一般概稱為培植體(explant)[7]。利用組織培養技術進行種苗大量繁殖之培養過程中某些培植體切口部位會產生類似淺褐色或深褐色的情況，通稱為褐化現象(browning)，Ziv和Halevy認為，發生此種異常現象的培植體通常率先褐化，然後其分泌釋放出的物質會擴散到培養基中，情形嚴重時甚致造成組織死亡[32]。在常見的情形下產生褐化的部位大多集中在切口或傷口處[19,20]，而且不論在癒合組織或試管苗都有可能發生。植物組織產生褐化現象之主要目的即在癒傷與抗菌，當植物受到傷害時，自體會傳遞一些訊息並隨即啓動氧化酵素的活性以進行生化反應之催化作用，且產生之二次代謝物質逐漸蓄積於傷口處，除了能避免汁液持續流出外，並具有防止病原菌感染的作用，而此種分泌物質大多為酚類化合物(phenolic compounds)，此亦是造成傷口處褐化之主要來源[22,26]。培植體產生褐化現象有可能是單一或多因子作用下產生的結果，在物理性的影響因子如光照強度、光週期與光質[21,24]、溫度[6]、傷口面積[28]、培植體的種類及狀態[19,23]；化學性的影響因子則有生長調節劑種類[18,31]、鹽類濃度[14]和酸鹼值[17]。由表1結果顯示，湖北貝母各部位培植體中褐化率最高者為葉片，次為莖段基部，而鱗片與PLB則有較低之褐化率，此可能與葉片部位含有較高的酚類化合物有關；此外，試驗進行時雖然葉片褐化率高達93.3%，但仍有一些葉片培植體可長出幼嫩鱗片，根據觀察，這些長出幼嫩鱗片之葉片培植體乃含有少許葉柄部分，而此靠近葉片之葉柄部位具有分生能力，可發育形成幼嫩鱗片而不致褐化，Kukulczanka等人也曾研究指出，以*Peperomia scandens*近葉柄端之葉片為培植體時，芽體分化能力較強，且以葉片近葉柄連接處最先誘導出芽體，顯示此區可能含較高的內生生長素因而較具分生能力[25]。

在進行植物組織培養時，常於培養基中添加不同種類及濃度的生長調節劑，藉以促進培植體生長與分化，現今使用較頻繁者多屬於auxin類(如NAA, 2,4-D)和cytokinin類(如BA, kinetin)，據Tsay等研究，上述兩類生長調節劑組成比例，會影響半夏珠芽所形成芽球類似體(PLB)之分化能力，當auxin含量較高時，有促進PLB大量繁殖或發根的作用；如cytokinin含量較高時，則促進PLB分化形成芽體[29]。Vuylsteke 和Langhe曾在培養基中添加10 μM BA以促進香蕉與芭蕉不定芽莖頂分生組織的增殖，但在誘導莖節再生時則建議降低BA含量至1 μM並配合1 μM IAA[30]。金花石蒜的鱗片組織培養，需先

預培養於黑暗處三個月，待產生白色膨大組織後，再用已添加30 mg/l NAA及30 mg/l BA之培養基誘導不定芽分化；如改以添加0.3-10 mg/l 2,4-D之培養基培養，則易產生呈透明水浸狀之癒合組織(12)。高氏(1996)曾歸納整理眾多學者研究報告指出，適當濃度的auxin可促進切離根與完整根之生長，而cytokinins能抑制根之生長，尤其是當根生長於黑暗狀況下時作用更明顯，其原因是由於降低了根內auxin含量的緣故(8)。劉和王(1996)曾報導利用含MS基本鹽類培養基並添加1 mg/l NAA、6 mg/l BA的培養基，成功誘導出93%太白貝母之癒合組織及再生鱗片(15)。張和楊(1995)也曾以中華貝母初萌幼莖作爲培植體，分別以添加不同濃度之NAA、2,4-D、BA及kinetin之培養基做初代培養；以添加1 mg/l NAA與5 mg/l BA之MS培養基做繼代培養，並進行再生小鱗莖、器官分化和體胚形成之研究(13)。蘇(1995)則將浙貝母種胚培養於添加了1 mg/l 2,4-D、0.5 mg/l BA及300 mg/l水解酪蛋白之MS培養基，成功誘導出小鱗莖和正常植株(16)。此外，暗紫貝母鱗莖再生技術之開發以及川貝母再生鱗片之培養，皆已獲致相當的成果，並且證實經組織培養獲得的培植體總生物鹼含量，可達原種及市售川貝母之2-4倍，且與原種鱗莖之游離全蛋白圖譜完全一致(4,11)。本研究表1也顯示，在MS培養基中添加0.5 mg/l BA時，以鱗片培植體誘導形成幼嫩小鱗片的能力最強，莖段基部與PLB次之；如取上述三種培植體，分別培養於添加0.5 mg/l BA和不同濃度NAA的培養基中，結果顯示，對莖段基部培植體而言，NAA濃度在0.25-4.0 mg/l時，有68-72%的再生鱗片誘導率(表2)；對鱗片培植體而言，NAA濃度在0.1-4.0 mg/l時，有62-78%的再生鱗片誘導率(表3)；但如以PLB培植體進行試驗，則培養基雖然添加0.1-4.0 mg/lNAA，最多仍只有38%的再生鱗片誘導率(表4)，因此，鱗片和莖段基部可能較適於誘導新鱗片再生。

表2. 培養基添加BA和NAA對湖北貝母莖段基部培植體生育之影響[z]

Table 2. Effects of BA and NAA in MS basal medium on growth of stem base segment of *F. hupehensis*[z]

BA	NAA	Bulbscale induced		Embryogenic callus induced		Root induced	
(mg/l)		%	95% CL[y]	%	95% CL[y]	%	95% CL[y]
0.5	0.1	42	28-57	18	9-31	18	9-31
0.5	0.25	70	56-82	18	9-31	26	15-41
0.5	0.5	68	54-80	24	13-38	22	12-36
0.5	1.0	72	57-84	34	21-48	22	12-36
0.5	2.0	70	56-82	26	15-41	32	20-46
0.5	4.0	72	57-84	50	36-64	58	43-72

[z] Cultured medium: Ms basic salts with different concentration of BA and NAA, 3% sucrose and 0.9% Difco agar, pH = 5.7. Sample size:50 segments per treatment.

[y] 95% confidence limits of binomial distribution.

表3. 培養基添加BA和NAA對湖北貝母鱗片培植體生育之影響[z]

Table 3. Effects of BA and NAA in MS basal medium on growth of bulb segment of *F. hupehensis*[z]

BA	NAA	Bulbscale induced		Embryogenic callus induced		Root induced	
(mg/l)		%	95% CL[y]	%	95% CL[y]	%	95% CL[y]
0.5	0.1	70	56-82	30	18-44	16	7-29
0.5	0.25	72	57-84	28	16-43	22	12-36
0.5	0.5	78	64-88	32	20-46	24	13-38
0.5	1.0	70	56-82	32	20-46	22	12-36
0.5	2.0	62	47-75	34	21-48	34	21-48
0.5	4.0	62	47-75	32	21-48	42	28-57

[z,y] Same as Table 2.

表4. 培養基添加BA和NAA對湖北貝母芽球相似體(PLB)生育之影響[z]

Table 4. Effects of BA and NAA in MS basal medium on growth of protocorm-like-body (PLB) of *F. hupehensis*[z]

BA	NAA	Bulbscale induced		Embryogenic callus induced		Root induced	
(mg/l)		%	95% CL[y]	%	95% CL[y]	%	95% CL[y]
0.5	0.1	22	12-36	34	21-48	14	6-27
0.5	0.25	24	13-38	24	13-38	16	7-29
0.5	0.5	36	23-50	38	25-53	22	12-36
0.5	1.0	38	25-53	32	20-46	20	10-34
0.5	2.0	34	21-48	28	16-43	36	23-50
0.5	4.0	18	9-31	28	16-43	32	20-46

[z,y] Same as Table 2.

此外，比較表2-4所提列有關擬胚化癒合組織和新根系之誘導產生方面，以莖段基部培植體培養於含0.5 mg/l BA和4.0 mg/l NAA 之MS培養基，能得到較高的誘導率。表5所示的結果，雖然分別以不同濃度2,4-D和NAA配合kinetin進行試驗，但不論是在誘導新鱗片再生或擬胚化癒合組織和新根系之誘導，效果似乎未盡理想。本試驗過程也觀察到湖北貝母接種約3週後，培植體有一些直接長出幼嫩鱗片，少數則形成擬胚化癒合組織，或是二者皆同時存在。有些擬胚化癒合組織會形成綠苗而長出幼嫩鱗片，此幼嫩鱗片有的可正常發育成正常植株(圖1)，但大部分則匍匐於擬胚化癒合組織之表面形成幼葉原基，雖然它們可以繼續生長成為一片松針狀之葉子，但大多數之葉原基極性不太正常，形成之葉片難直立，僅能匍匐於癒合組織表面(圖2)。

表5. 培養基添加Auxin類植物生長調節劑及暗培養對湖北貝母鱗片培植體生育之影響[z]

Table 5. Effects of auxins in MS basal medium and under dark condition on growth of bulb segment of *F. hupehensis*[z]

BA	NAA	Bulbscale induced			Embryogenic callus induced		Root induced		
(mg/l)		%	95% CL[y]	Average No.[x]	%	95% CL[y]	%	95% CL[y]	Average No.[w]
0	0	43.3	25-63	2.4	16.7	6-35	6.7	1-22	2.0
0.5	0	63.3	44-80	3.4	10.0	2-27	10.0	2-27	1.0
1	0	66.7	47-83	4.5	16.7	6-35	3.3	0-17	2.0
2	0	46.7	28-66	5.3	10.0	2-27	6.7	1-22	1.3
4	0	53.3	34-72	3.7	3.3	0-17	10.0	2-27	1.5
8	0	23.3	10-43	1.6	6.7	1-22	10.0	2-27	1.7
0	0.5	50.0	31-69	3.4	13.3	4-31	16.7	6-35	3.0
0	1	53.3	34-72	2.3	30.0	15-50	36.7	20-56	2.2
0	2	56.7	37-75	4.4	23.3	10-43	36.7	20-56	4.8
0	4	56.7	37-75	5.8	23.3	10-43	53.3	34-72	3.2
0	8	56.7	37-75	2.7	23.3	10-43	46.7	28-66	4.7

[z] Cultured medium: MS basic salts with different concentration of auxins, 0.5 mg/l kinetin, 3% sucrose and 0.9% Difco agar, pH = 5.7.

Sample size:30 segments per treatment.

[y] 95% confidence limits of binomial distribution.

[x] Average No. = Total No. of bulbscales produced / No. of explant producing bulbscales

[w] Average No. = Total No. of roots produced / No. of explant producing roots

雖然本研究初步結果顯示利用湖北貝母之鱗片、莖基部及PLB在 0.5 mg/l BA配合適當濃度NAA的MS培養基誘導下，可使之形成多數芽體並達到大量繁殖湖北貝母之目的，但對於下列幾項要點，例如供試培養基對增重效果之影響；濕度條件對於培植體生育之影響；液態培養條件之檢討，以及對培植體繁殖倍率之調查等，仍有需要加強之處，如能將研究結果與現今應用廣泛之浙貝母市售品作進

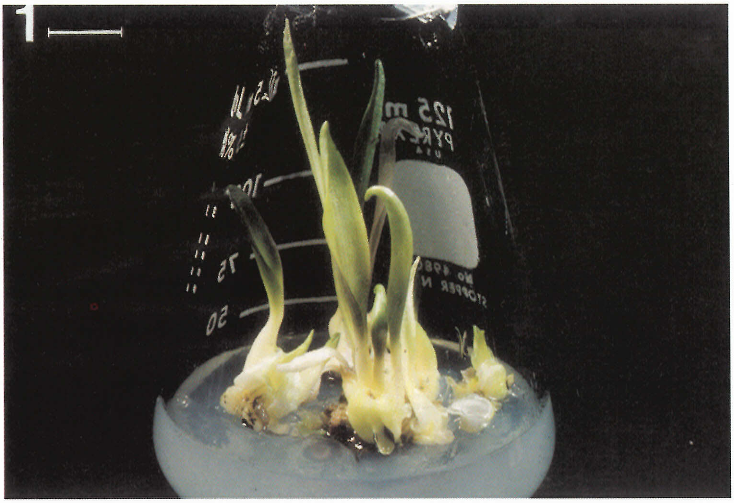

圖1. 湖北貝母鱗片培植體培養於含MS基本鹽類並添加0.5 mg/l BA、0.5 mg/l NAA、3%蔗糖及0.9% Difco洋菜之培養基80天後，發育成植株形態。(比例尺＝1公分)

Fig. 1 The phenotypic appearance of *F. hupehensis* bulb segment cultured for 80 days on solid MS medium supplement with 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, 3% sucrose and 0.9% Difco agar. (Scale bar = 1 cm)

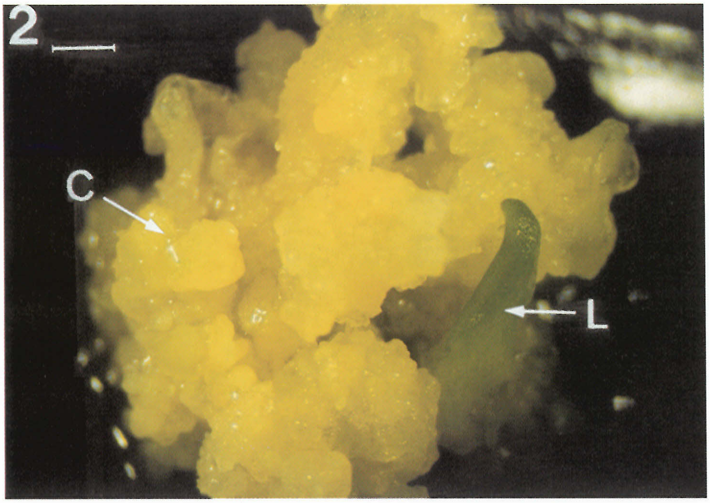

圖2. 湖北貝母芽球相似體(PLB)培養於含MS基本鹽類並添加0.5 mg/l BA、0.5 mg/l NAA、3%蔗糖及0.9% Difco洋菜之培養基60天後，形成擬胚化癒合組織(C)及葉片(L)。(比例尺＝0.2公分)

Fig. 2 The embryogenic callus (C) and leaf (L) formation of *F. hupehensis* protocorm-like-body (PLB) segment cultured for 60 days on solid MS medium supplement with 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, 3% sucrose and 0.9% Difco agar. (Scale bar = 0.2 cm)

一步藥效、藥理之分析比較，相信更有學術上的應用價值，本單位將持續進行相關問題之探討研究。

誌　謝

本研究承行政院衛生署中醫藥委員會經費補助(CCMP86-RD-040)，謹此申謝。

引用文獻

1. 王芳、葉太志。1992。湖北貝母的有性雜交及繁殖試驗。時珍國藥研究3(1): 30-32。
2. 王煥華、儲農、倪惠珠。1998。苦花一貝母。中國藥話集。第50-54頁。旺文社出版。台北市。
3. 由金文。1995。恩施州十種地道藥材。中藥材18(1): 9-10。
4. 李隆雲、代敏。1995。暗紫貝母鱗莖再生組織培養技術研究。中國中藥雜誌20(2): 78-80。北京市。
5. 明李時珍原著。1974重刊。新校本草綱目(甘偉松增訂)。中冊卷13草部第59-61頁。宏業書局出版。台北市。
6. 易希道。1991。最新植物生理學。第170-175頁。環球書社出版。台北市。
7. 馬溯軒、許圳塗。1992。植物組織培養發展概況。園藝作物組織培養實用技術。第11-13頁。豐年社出版。台北市。
8. 高景輝。1996。植物生長與分化。第335-338頁。國立編譯館主編。台北市。
9. 清汪訒庵原著。1994重刊。新版本草備要(文光醫學叢書編輯委員會編輯)。第64-66頁。文光公司出版。台北市。
10. 清趙學敏原著。1978重刊。本草綱目拾遺。卷5草部下第139頁。旋風出版社出版。台北市。
11. 陳敏、鍾鳳林。1995。川貝母組織培養的研究。中國中藥雜誌20(8): 461-462。北京市。
12. 黃麗春、劉定明。1992。金花石蒜的組織培養。園藝作物組織培養實用技術。第116-120頁。豐年社出版。台北市。
13. 張浩、楊亮先。1995。中華貝母幼莖培養及器官與體細胞胚的發生。華西醫科大學學報26(1): 33-37。成都市。
14. 蔡佩君。1993。澳洲胡桃莖頂組織培養之研究。國立中興大學園藝研究所碩士論文。第33-36頁。台中市。
15. 劉玉紅、王淑強。1996。太白貝母的快速繁殖試驗。中國中藥雜誌21(1): 15-17。北京市。
16. 蘇新。1995。浙貝母種胚的離體培養。中藥材18(2): 62-63。廣州市。
17. Arora, S. K. 1969. Browning of phenols and its inhibition by aliphatic acids. Z. Naturforschg 24：1198-1199.
18. Asahira, T., and J. P. Nitsch. 1969. Effect of polarity and kinetin on the browning reaction of *Dioscorea batatas* and *D. japonila.* Planta 84: 292-294.
19. Bhat, S. R., and K. P. S. Chandel. 1991. A novel technique to overcome browning in tissue culture. Plant Cell Rep. 10: 358-361.
20. Bostock, R. M., and B. A. Stermer. 1989. Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 343-371.
21. Cassells, A. C., and G. Minas. 1983. Plant and *in vitro* factors influencing the micropropagation of *Pelargonium* cultivars by bud-tip culture. Scientia Horticulturae 21: 53-65.
22. Cheng, G. W., and C. H. Crisosto. 1995. Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 835-838.
23. Compton, M. E., and J. E. Preece. 1988. Response of tobacco callus to shoot tip exudation from five species. HortSci. 23: 208-210.
24. Creasy, L. L. 1968. The increase in phenylalanine ammonialyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. Phytochemistry 7: 441-446.
25. Kukulczanka, K., K. Klimaszewska, and H. pluta. 1977. Regeneration of entire plant of *Peperomia scandens* Ruiz from different parts of leaves *in vitro*. Acta Hort.78: 365-369.
26. Marks, T. R., and S. E. Simpson. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. J. of Hort. Sci. 65: 103-111.
27. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
28. Ripley, K. P., and J. E. Preece. 1986. Micropropagation of *Euphorbia Lathyris* L. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 5: 213-218.
29. Tsay, H. S., T. G. Gau, and C. C. Chen, 1989. Rapid clonal propagation of *Pinella ternata* by tissue culture. Plant Cell Rep. 8:

450-454.

30. Vuylsteke, D., and E. De Langhe, 1985. Feasibilty of *in vitro* propagation of bananas and plantains. Trop. Agric. (Trinidad) 62: 323-328.

31. Zaid, A. 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures — a review. Acta Hort. 212: 561-566.

32. Ziv, M., and A. H. Halevy. 1983. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. HortSci. 18: 434-436.

Studies on the Tissue Culture of *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia

I. The Induction of Bulbscale and Embryogenic Callus from Different Source Explants[1]

Yih-Juh Shiau[2], Chung-Der Tai[3], Chung-Chuan Chen[3] and Hsin-Sheng Tsay[2]

Summary

Bei-mu was first recorded in Shen-Nung-Pen-Ts'ao-Ching under the middle herb catogory and was recorded in successive Pen-ts'aos of the descending dynasties. It has been used as anti tissue and expectorant for the care of coughing and the prevention of phlegm formation. As the amount of bulb collected from naturally-grown and traditionally-cultured plants is far from enough for medicinal demand, tissue culture method of mass propagation was therefore studied. For the comparison on the efficiency of new bulbscale production among various explants cultured on solid medium containing MS basic salts and 0.5 mg/l BA concentration for 60 days, bulbscale explant showed the highest percentage (54.7%) followed by stem base , protocorm-like-body (PLB) , and leaf blade. On the contrary, the order of browning percentage during the culturing period was reversed for the four explants. The stem base explant could produce the highest number of bulbscale (5.6 per culture). The induction percentages of embryogenic callus were higher for PLB and stem base (36.1% & 30.6%, respectively). Addition of 0.5 mg/l BA and 0.25-4 mg/l NAA to the MS medium resulted in increased efficiency of bulbscale formation, e.g., from 68-72% for stem base explant and 62-78%for bulbscale explant. NAA in the concentration range of 4 mg/l could also promote the rooting ability and embryogenic callus formation of the explants.

Key words : *Fritillaria hapehensis* Hsiao *et* K.C.Hsia, Protocorm like body, Tissue culture, Mass propagation.

1. Contribution No.2042 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.
2. Respectively, Research Assistant and Senior Agronomist, Department of Agronomy, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung , Taiwan , ROC.
3. Former graduate student and Associate Professor of Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Science, China Medical College, Taichung , Taiwan , ROC.